

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Lisica

Prijenos proteina APP u organelima endocitoznog puta u
stanicama CHO NPC1-null

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godine

Ovaj diplomski rad izređen je pod vodstvom dr. sc. Silve Katušić Hećimović i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Dubravke Hranilović u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, u sklopu sveučilišnog dodiplomskog studija biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Hvala dr. sc. Silvi Katušić Hećimović što mi je omogućila izradu diplomskog rada. Hvala na svim razgovorima, savjetima, raspravama, te na ugodnoj i stimulativnoj atmosferi.

Hvala dipl. ing. Martini Malnar i dipl. ing. Marku Košičeku na praktičnim savjetima, strpljenju i odgovorima na pitanja.

Hvala Ani što je uskakala kad god je trebalo.

Najveće hvala mami, tati i sestrama na svemu.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Prijenos proteina APP u organelima endocitoznog puta u stanicama CHO NPC1-null

Ana Lisica

Laboratorij za molekularnu neurofarmakologiju

Zavod za molekularnu medicinu

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

Promijenjen metabolizam i povećana sinteza peptida amiloid β ($A\beta$) smatra se ključnim događajem u razvoju Alzheimerove bolesti (AB). Nedavna istraživanja su pokazala da razina kolesterola utječe na procesiranje prekursora proteina amiloid β (APP), te utječe na stvaranje i razinu peptida $A\beta$. Nakupljanje kolesterola i značajno povećanje razine peptida $A\beta$ uočeno je i u Niemann Pickovoj bolesti tipa C (NPC), nasljednoj bolesti nakupljanja lipida, pa se ova bolest pokazala kao dobar model u proučavanju mehanizma djelovanja kolesterola na razvoj AB. Cilj rada je bio ispitati utječe li nakupljanje kolesterola u bolesti NPC na promijenjen smještaj proteina APP i presenilina 1 (PS1) u staničnim organelima endocitoznog puta. Korištenjem modelnih stanica CHO NPC1^{-/-} i stanica divljeg tipa (CHOwt), pokazano je da stanice CHO NPC1^{-/-} pokazuju promijenjen smještaj proteina APP u ranim i reciklirajućim endosomima. Stanice CHO NPC1^{-/-} pokazuju promijenjeno bojanje biljega za rane i reciklirajuće endosome što ukazuje na njihovo nakupljanje na periferiji stanice. Međutim nije pokazan promijenjen smještaj proteina PS1 u organelima endocitoznog puta. Ovi rezultati ukazuju da bi kolesterol mogao djelovati na nastanak AB tako da regulira smještaj proteina APP unutar staničnih organela endocitoznog puta, te da takva preraspodjela proteina APP dovodi do povećanog stvaranja odsječka C99, te peptida $A\beta$ u ovim organelima.

(34 stranice, 9 slika, 2 tablice, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: APP, prekursor proteina amiloid beta, kolesterol, bolest NPC, Niemann Pickova bolest tipa C, Alzheimerova bolest.

Voditelj: Dr. sc. Silva Katušić Hećimović

Suvoditelj: Dr. sc. Dubravka Hranilović, docentica

Ocijenitelji: Dr. sc. Silva Katušić Hećimović

Dr. sc. Dubravka Hranilović, docentica

Dr. sc. Željka Vidaković Cifrek, docentica

Dr. sc. Maja Matulić, docentica

Rad prihvaćen: 11. studenog 2009.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of biology

Graduation Thesis

Transport of APP protein in organelles of endocytic pathway in CHO NPC1-null cells

Ana Lisica

Laboratory for Molecular Neuropharmacology
Department of Molecular Medicine
Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

Altered metabolism and increased formation of amyloid- β peptide ($A\beta$) is considered to be the key event in development of Alzheimer's disease (AD). Recent reports have shown that cholesterol levels modulate processing of amyloid- β precursor protein (APP) and formation of $A\beta$ peptide. Cholesterol accumulation and increased levels of $A\beta$ peptide have also been observed in Niemann-Pick type C disease (NPC), hereditary sphingolipid storage disorder, which has become an important model to study the role of cholesterol in the pathogenesis of AD. The goal of this work was to investigate whether cholesterol accumulation in NPC disease changes distribution of APP protein and presenilin 1 (PS1) within endocytic pathway. Using immunoconfocal microscopy, we observed altered localization of APP protein in early and recycling endosomes in CHO NPC1^{-/-} compared to CHOwt cells. In addition, we detected altered staining of markers for early (EEA1) and recycling (transferrin receptor, TFR) endosomes in CHO NPC1^{-/-} cells, which suggests their accumulation on the cell periphery. However, altered localization of PS1 was not observed in endocytic organelles. These results suggest that cholesterol may influence the onset of AD by regulating trafficking of APP protein within endocytic pathway, and that this redistribution of APP protein leads to increased synthesis of C99, and $A\beta$ peptide in these organelles.

(34 pages, 9 figures, 2 tables, 50 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central biological library.

Key words: APP, beta-amyloid precursor protein, cholesterol, NPC disease, Niemann-Pick type C, Alzheimer's disease.

Supervisor: Silva Katušić Hećimović, PhD, Research Associate

Co-supervisor: Dubravka Hranilović, PhD, Assistant Professor

Reviewers: Dubravka Hranilović, PhD, Assistant Professor
Silva Katušić Hećimović, PhD, Research Associate
Željka Vidaković Cifrek, PhD, Assistant Professor
Maja Matulić, PhD, Assistant Professor

Thesis accepted: 11th November 2009.

Sadržaj

Popis kratica.....	3
Uvod.....	4
Povijest Alzheimerove bolesti.....	4
Kliničke karakteristike Alzheimerove bolesti	5
Neuropatološke karakteristike Alzheimerove bolesti	6
Molekularna osnova Alzheimerove bolesti - procesiranje proteina APP	7
Veza između kolesterola i Alzheimerove bolesti	10
Niemann Pickova bolest tipa C	10
Cilj rada	13
Materijali i metode	14
Stanične linije.....	14
Stvaranje stabilnih staničnih linija	14
Bojanje slobodnog kolesterola filipinom	15
Priprava staničnog lizata	16
Određivanje koncentracije proteina	16
Elektroforeza u gelu poliakrilamida	16
Western analiza	17
Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija	18
Rezultati.....	20
Uspostava staničnih linija CHOWt i CHO-NPC1 ^{-/-} koje stabilno eksprimiraju protein APP	20
Ispitivanje smještaja proteina APP i njegovog C-terminalnog odsječka C99 u endosomalnom putu u staničnim linijama CHOWt i CHO NPC ^{-/-} koje stabilno eksprimiraju protein APP	22
Ispitivanje smještaja proteina PS1 u ranim i kasnim endosomima u stanicama CHOWt i CHO NPC1 ^{-/-}	25

Rasprava	27
Zaključak	30
Literatura	31

Popis kratica

A β – peptid amiloid beta

A β_{40} – peptid amiloid beta 40

A β_{42} – peptid amiloid beta 42

AB – Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*)

AICD – unutarstanična domena proteina APP (engl. *APP intracellular domain*)

APP – prekursor proteina amiloid beta

sAPP α/β – topivi oblici N-terminalnog odsječka proteina APP dobivenog nakon cijepanja enzimom α -, odnosno β -sekretazom

CHO – stanice jajnika kineskog hrčka (engl. *chinese hamster ovary*)

CHOwt – stanice jajnika kineskog hrčka divljeg tipa

CHO NPC1^{-/-} – CHO NPC1-null, stanice jajnika kineskog hrčka koje nemaju gen *NPC1*

CTF α/β (C83/C99) – C-terminalni odsječak proteina APP dobiven nakon cijepanja enzimom α -, odnosno β -sekretazom

LDL – lipoprotein male gustoće (engl. *low density lipoprotein*)

LSD – lizosomske bolesti nakupljanja (engl. *lysosomal storage disorders*)

NPC – bolest Niemann-Pick tipa C

NPC1 – protein Niemann-Pick tipa C1

NPC2 – protein Niemann-Pick tipa C2

PS1 – presenilin 1

PS2 – presenilin 2

SLSD – bolesti nakupljanja lipida (engl. *sphingolipid storage disorders*)

Uvod

Alzheimerova bolest (AB) je neurodegenerativna bolest i najčešći oblik demencije (na AB otpada 50-70% svih oblika demencije). Smatra se da od nje boluje 25 milijuna ljudi širom svijeta, a u razvijenim zemljama je četvrti najčešći uzročnik smrti (Hartmann i sur. 2007). S obzirom da se AB javlja u starijoj životnoj dobi, strahuje se da će s povećanjem kvalitete života pa tako i s povećanjem broja starijih osoba, broj osoba s ovom bolesti kontinuirano rasti. Predviđa se da će broj oboljelih doseći 81 milijun u 2040. god. ukoliko se uskoro ne pronađe oblik liječenja koji bi usporio progresiju bolesti ili spriječio njen nastanak.

Alzheimerovu bolest je prvi opisao njemački liječnik Alois Alzheimer još 1906. godine te je po prvi puta identificirao tipične patološke lezije u mozgu pacijenata s AB: amiloidne plakove (engl. *amyloid/senile plaques*) i neurofibrilarne čvorove (engl. *neurofibrillary tangles*), koji su i danas glavne patološke karakteristike bolesti. Naime, definitivna dijagnoza AB još uvijek se može dobiti samo dokazom prisutnosti amiloidnih plakova i neurofibrilarnih niti u mozgu, a za vrijeme života se može govoriti samo o vjerojatnoj ili mogućoj dijagnozi Alzheimerove bolesti.

Simptomi bolesti se pogoršavaju s vremenom, te u konačnici bolest završava fatalno. Još uvijek ne postoji adekvatan lijek, no mogu se tretirati simptomi bolesti kako bi život s AB bio lakši i ugodniji. Zbog sve većeg broja oboljelih postoji zajednički svjetski napor u pronalaženju boljih načina liječenja, sprječavanju njenog nastanka i usporavanju razvoja Alzheimerove bolesti.

Povijest Alzheimerove bolesti

Progresivne mentalne bolesti koje su zahvaćale stariju populaciju su bile opisivane stoljećima. Međutim, tek je Dr. Alois Alzheimer specifično identificirao niz abnormalnosti u mozgu takvih pacijenata, povezao ih sa simptomima i klasificirao kao bolest. U studenom 1906. Alzheimer je izložio slučaj njemačkim neuropsihijatrima u predavanju pod naslovom "Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" (njem. „O izuzetnoj bolesti moždane kore“). Izložio je slučaj 55-godišnje Auguste Deter, koja je postala dementna u relativno mladoj dobi. Augusta je imala probleme s pamćenjem,

neutemeljene sumnje da joj je suprug nevjeran, poteškoće u razgovoru i razumijevanju. Njeni simptomi su se ubrzano pogoršavali, te je umrla nekoliko godina nakon početka promatranja. Pri autopsiji mozga, Alzheimer je primijetio da je kod pacijentice došlo do smanjenja volumena mozga, pogotovo moždane kore, a pod mikroskopom je uočio naslage u krvnim žilama, mrtve živčane stanice, te patološke naslage oko stanica (amiloidne plakove) i neurofibrilarne čvorove unutar stanica (Verhey 2009).



Slika 1. Alois Alzheimer, njemački psihijatar i neuropatolog (1864.-1915.). (Slika preuzeta s www.alz.org)

Kliničke karakteristike Alzheimerove bolesti

Iako svaki pacijent može individualno doživjeti bolest, postoje mnogi zajednički simptomi. Najranije simptome je vrlo teško uočiti i lako ih je zamijeniti za obične poteškoće koje dolaze sa starenjem. Postoji nekoliko stadija bolesti (Förstl i Kurz 1999).

Prvi ili blagi stadij može trajati od 2 do 4 godine. Oboljeli su manje živahni, pokazuju manje gubitke pamćenja, promjene raspoloženja, sporo uče i reagiraju. Počinju izbjegavati ljude i određena mjesta, postaju zbunjeni, imaju poteškoća pri planiranju i organiziranju, lako se izgube i slabo procjenjuju situacije. Imaju poteškoće pri obavljanju svakodnevnih zadaća, u komuniciranju, u razumijevanju napisanog. Zbog pojave navedenih simptoma, pojedinci mogu postati ljuti i frustrirani.

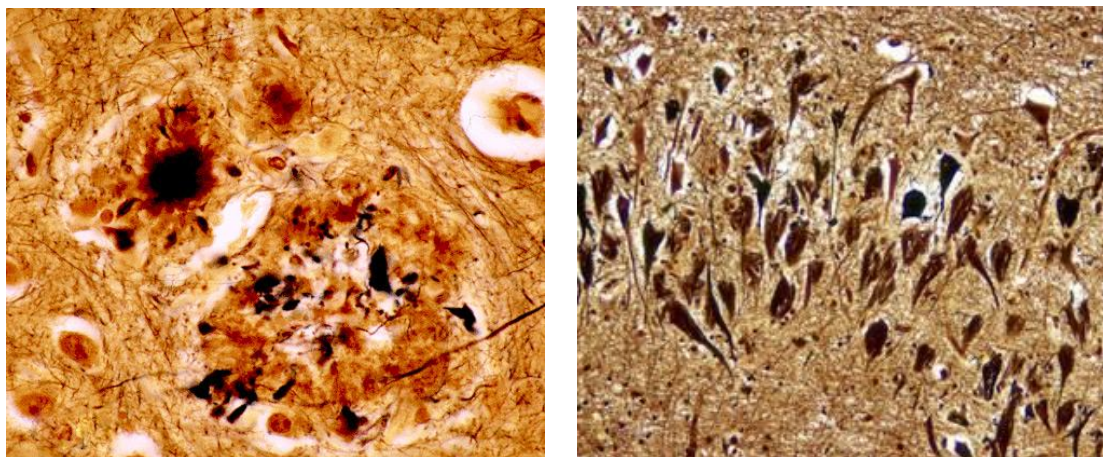
Drugi ili umjereni stadij može trajati od 2 do 10 godina. Pacijenti mogu još uvijek obavljati neovisno jednostavne zadaće, ali treba im pomoć pri obavljanju složenih. Zaboravljaju nedavne događaje i svoju vlastitu prošlost, postaju još više izgubljeni i

odvojeni od stvarnosti. Sjećanja davne prošlosti se isprepliću s nedavnim događajima. Imaju poteškoće u prepoznavanju osoba. Pojavljuju se problemi s govorom i razumijevanjem, čitanje i pisanje je otežano, a pojedinci mogu početi i izmišljati riječi. Više ih nije sigurno ostavljati same. Kako oboljeli postaju svjesni svog težeg stanja, postaju sve više depresivni, nemirni, apatični i povlače se u osamu.

Treći ili krajnji stadij traje od 1 do 3 godina. Tijekom ovog finalnog stadija, ljudi izgube sposobnost samostalnog hranjenja, sposobnost govora, prepoznavanja ljudi i kontroliranja tjelesnih funkcija. Pamćenje se pogoršava. Nužna je stalna njega. U stanju opće oslabiljenosti, pacijenti mogu biti podložni i drugim bolestima: kožnim infekcijama, dišnim problemima (Förstl i Kurz 1999).

Neuropatološke karakteristike Alzheimerove bolesti

Neuropatologija Alzheimerove bolesti je karakterizirana agregatima izvanstaničnog peptida amiloid beta ($A\beta$), formiranjem neurofibrilarnih čvorova, neuronskom i sinaptičkom disfunkcijom, gubitkom neurona i sinapsi, neurovaskularnom disfunkcijom, upalnim procesima i oksidativnim stresom (Selkoe 2001).



Slika 2. Senilni plakovi (lijevo) i neurofibrilarni čvorovi (desno). Bielschowski obojanje. (Slika preuzeta s <http://neuropathology.neoucom.edu/chapter9/chapter9bAD.html>)

Senilni plakovi su guste, sferične, izvanstanične nakupine u moždanoj kori. Variraju u veličini, ali su uglavnom do 100 mikrona u promjeru. Sastoje se većinom od peptida $A\beta$ i staničnog materijala. Postoji cijeli niz različitih struktura i tekstura senilnih plakova u mozgu AB pacijenata (Cruz i sur. 1997). Neurofibrilarni čvorovi su nakupine tau proteina u

tijelu neurona. Hiperfosforilacija proteina tau uzrokuje njegovo agregiranje i stvaranje netopivih čvorova (Selkoe 2001). I senilni plakovi i neurofibrilarni čvorovi se mogu pojaviti neovisno. Upravo činjenica da se neurofibrilarni čvorovi mogu pojaviti neovisno o nakupinama A β , upućuje da se čvorovi mogu javiti kao sekundarna posljedica. Sve je više dokaza da su čvorovi jedan od citoloških odgovora neurona na nakupljanje A β , te je prevladavajuće mišljenje da su primarne lezije u Alzheimerovoj bolesti nakupine peptida A β tj. senilni plakovi (Hardy i Selkoe 2002).

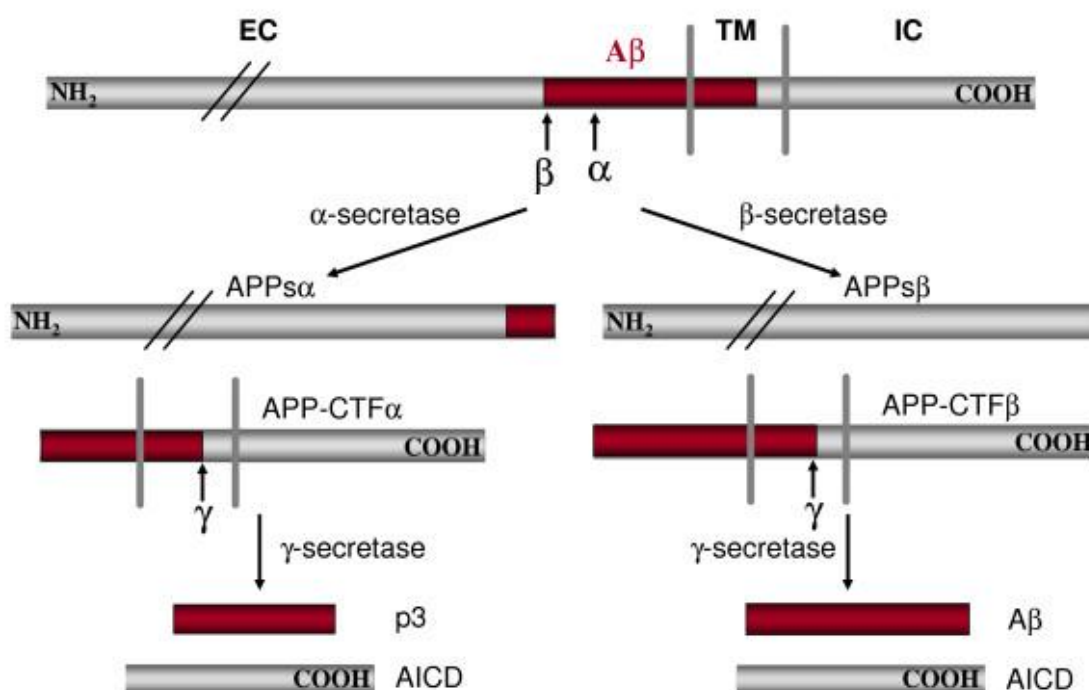
Molekularna osnova Alzheimerove bolesti - procesiranje proteina APP

Prema hipotezi amiloidne kaskade, promijenjen metabolizam i nakupljanje peptida amiloid beta (A β) je glavni uzročnik nastanka AB. Ostali simptomi, uključujući formiranje neurofibrilarnih čvorova, nastaju kao rezultat neravnoteže između stvaranja i odvođenja peptida A β (Hardy i Selkoe 2002). Peptid A β nastaje cijepanjem prekursora proteina amiloid beta (APP).

APP je član obitelji konzerviranih membranskih proteina tipa I, koja uključuje APL-1 u *C. elegans*, APPL u *D. melanogaster*, te APP, APP like protein 1 i 2 (APLP1 i APLP2) u sisavaca. Zanimljivo, A β domena nije očuvana, te je karakteristična samo za APP (Zheng i Koo 2006). APP obuhvaća heterogenu grupu proteina veliku od 110 do 140 kDa (Selkoe i sur. 1988). Ova heterogenost proizlazi iz alternativnog izrezivanja (engl. *splicing*), čime nastaju tri glavne izoforme od 695, 751 i 770 aminokiselina; kao i zbog različitih posttranslacijskih modifikacija, uključujući N- i O-glikozilaciju, sulfataciju i fosforilaciju (Hung i Selkoe 1994). Oblici proteina APP dugi 751 i 770 aminokiselina su eksprimirani uglavnom u neneuronskim stanicama tijela, te manje u neuronima; dok je 695 aminokiselina duga forma proteina APP visoko eksprimirana u neuronima, te vrlo nisko u ostatku organizma (Haass i sur. 1991).

Prekursor proteina amiloid beta (APP) se cijepa s najmanje 3 proteaze, nazvane α , β i γ (Slika 3). Cijepanje s α - i β -sekretazom u ekstracelularnom dijelu rezultira s nastajanjem velike topive podjedinice koju nazivamo sAPP α ili sAPP β (engl. *soluble APP α/β*), te membranski vezanog α ili β C-terminalnog odsječka (engl. *CTF, carboxy terminal fragment*; C83/C99). γ -Sekretaza cijepa α i β C-terminalne odsječke (C83/C99) unutar njihove transmembranske domene stvarajući 3 kDa velik produkt p3 (u kombinaciji s α -

sekretazom) ili 4 kDa velik produkt A β peptid (u kombinaciji s β -sekretazom), te unutarstanične domene APP-a (AICD, engl. *APP intracellular domain*) (Zheng i Koo 2006).



Slika 3. Shematski prikaz procesiranja proteina APP. EC: izvanstanični; TM: transmembranski; IC: unutarstanični. (Slika preuzeta iz Zheng H. i Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 3, 1-5.)

Nekoliko cink metaloproteaza, uključujući TACE/ADAM17 (engl. *tumor necrosis α -converting enzyme; a disintegrin and metalloprotease*), ADAM9, ADAM10 i MDC-9, mogu cijepati APP na α -sekretaznom mjestu lociranom unutar A β domene. Nastali sAPP α imaju ulogu u zaštiti i razvoju neurona (Annaert i De Strooper 2000).

Glavna neuronska β -sekretaza je transmembranska aspartil proteaza BACE1 (engl. *β -site APP cleaving enzyme*). BACE1 je uglavnom eksprimiran u neuronima, enzim funkcionira optimalno pri nižem pH, te se stoga većinom nalazi u Golgijevom aparatu i lizosomima (Vassar i sur. 1999). β -sekretaza ima veći afinitet za oblike proteina APP koji

imaju tzv. Swedish mutaciju, koja je uzročnik nasljednog oblika AB (Annaert i De Strooper 2000).

γ -Sekretaza cijepa peptidnu vezu unutar hidrofobnog okruženja stanične membrane. Ovaj enzim ne cijepa samo APP, već i druge transmembranske proteine, npr. APLP1, APLP2, Notch 1-4, ErbB-4, E-cadherin, LRP, Nectin, Jagged, CD44. Kompleks uključuje presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2), nikastrin, APH1 (engl. *anterior pharynx defective*) i PEN2 (engl. *presenilin enhancer*). Ova posljednja tri su vjerojatno kofaktori u kompleksu, dok presenilini čine aktivni centar γ -sekretaze (Kimberly i sur. 2000).

APP ima brojne fiziološke funkcije u organizmu, a mnoge od njih su još uvijek neotkrivene. APP je bitan tijekom razvoja mozga, nužan je za razvoj i adheziju neurona, te razvoj aksona. Uključen je u staničnu mobilnost i regulaciju transkripcije, veže se za razne komponente izvanstaničnog matriksa kao što su heparin i kolagen 1, regulira promet iona bakra i cinka (Kimberly i sur. 2001; Nikolaev i sur. 2009). APP je bitan zbog uloge u funkciji neurona i sinapsi, te je stoga vrlo složeno reguliran. Uključen je u Notch signalni put, apoptozne signalne puteve, a promjene u signalnim putevima u kojima sudjeluje dovode do AB patologije (Zheng i Koo 2006).

Ranije se smatralo da je stvaranje A β patološki događaj, međutim, kasnije se otkrilo da se radi o normalnom metaboličkom procesu, te je peptid detektiran u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini zdravih osoba tijekom cijelog života (Shoji i sur. 1992). Smatra se da ima ulogu u reduciranju metala, te da se radi o lipofilnom helatoru metala. A β veže bakar, cink i željezo, ujedno se veže i za lipoproteine i apolipoproteine u cerebrospinalnoj tekućini i na HDL (engl. *high density lipoproteins*) čestice u plazmi, inhibirajući oksidaciju lipoproteina (Walter i sur. 1997).

Dakle, iako se prvotno smatralo drukčije, istraživanja su pokazala da je A β normalni metabolički produkt svake stanice (Haass i sur. 1992). U normalnim uvjetima se peptid A β odvodi i uklanja iz neurona. Upravo neravnoteža između proizvodnje i uklanjanja se smatra primarnim događajem koji dovodi do nastanka Alzheimerove bolesti, kao i promijenjeno procesiranje proteina APP u vidu povećanog stvaranja A β . Ovome u prilog idu i činjenice da se mutacije koje uzrokuju nasljedni oblik Alzheimerove bolesti nalaze u genima za APP i za enzime koji ga procesiraju (PS1 ili PS2).

Veza između kolesterola i Alzheimerove bolesti

Prva indikacija da bi lipidi mogli igrati važnu ulogu u procesiranju proteina APP i proizvodnji A β je proizišla iz činjenice da su svi proteini uključeni u procesiranje transmembranski. Štoviše, γ -sekretaza cijepa peptidnu vezu usred hidrofobnog okruženja stanične membrane (Grziwa i sur. 2003). Mozak je kolesterolom najbogatiji organ u tijelu i sadrži oko 25% ukupnog tjelesnog kolesterola. Kolesterol je ujedno esencijalni faktor svih staničnih membrana. Postoji sve više dokaza za postojanje veze između povišene razine A β i kolesterola. Pokazano je da statini, lijekovi koji se koriste u liječenju hiperkolesterolemije, a djeluju tako da sprječavaju *de novo* sintezu kolesterola inhibirajući 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktazu, smanjuju proizvodnju A β (Wolozin i sur. 2000). Prisutnost E4 izoforme apolipoproteina E, esencijalne molekule u metabolizmu kolesterola je snažan rizičan faktor za razvoj AB (Corder i sur. 1993). Prehrana bogata kolesterolom povišuje razinu A β u transgeničnih miševa (Refolo i sur. 2000). Supresija *de novo* sinteze kolesterola smanjuje stvaranje A β *in vivo* i *in vitro* (Fears i sur. 1999; Refolo i sur. 2001; Simons i sur. 1998). Protein APP kao i β - i γ -sekretaza su smješteni u membranama bogatim kolesterolom i sfingolipidima, tzv. lipidnim splavima (od engl. *lipid rafts*) (Riddell i sur. 2001), a kolesterol pospješuje cijepanje proteina APP γ -sekretazom (Wahrle i sur. 2002). Nadalje, nivoi ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola (engl. *low density lipoproteins*), ali ne i HDL-kolesterola u serumu koreliraju s količinom A β_{42} u mozgu pacijenata s AB (Kuo i sur. 1998). Međutim, unatoč svim ovim nalascima, detaljan mehanizam djelovanja kolesterola na stvaranje/razgradnju peptida A β još uvijek nije poznat.

Niemann Pickova bolest tipa C

Osim u Alzheimerovoj bolesti, veza između kolesterola i peptida A β je uočena i u Niemann Pickovoj bolesti tipa C (NPC) (Distl i sur. 2003). Radi se o autosomalnom, recesivnom poremećaju nakupljanja sfingolipida (engl. *SLSD-sphingolipid storage disease*) koji je karakteriziran progresivnom neurodegeneracijom. Ovaj poremećaj je uzrokovan mutacijom u *NPC1* (95% slučajeva) ili u *NPC2* genu. Klinički simptomi bolesti (napadaji, distonija, ataksija, disartrija, spazam, gubitak vida, promjene kognitivnih sposobnosti i ponašanja) se javljaju u ranom djetinjstvu, a smrt obično nastupa u tinejdžerskoj dobi.

Trenutno ne postoji efikasno liječenje NPC bolesti (Vance 2006). Histološko svojstvo oboljelih je gubitak neurona, dok na staničnom nivou dolazi do nakupljanja neesterificiranog kolesterola, sfingozina, glikosfingozina i sfingomijelina u kasnim endosomima i lizosomima (Liscum i sur. 1989; Ory 2004). Za razliku od nekoliko drugih sfingolipidoza, koje su rezultat nefunkcionalnog enzima, bolest NPC je rezultat nefunkcionalnog transporta kolesterola unutar stanice (Ikonen i Hölttä-Vuori 2004).

Gen *NPC1* kodira za transmembranski protein dug 1278 aminokiselina. Pet od 13 transmembranskih domena su senzorske domene za sterole (engl. *SSD, sterol sensing domains*), koje posjeduju i neki enzimi uključeni u metabolizam lipida: HMG-CoA (3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A) reduktaza, SREBP (engl. *sterol-regulatory element binding protein*), SCAP (engl. *sterol cleavage-activating protein*) i SREBP (engl. *sterol-regulatory element binding protein*) (Carstea i sur. 1997). SSD domena je odgovorna za direktno vezanje sterola i proteina modificiranih sterolima, a većina mutacija u ovoj domeni proteina NPC1 je povezana s vrlo teškim fenotipima bolesti, što naglašava njenu funkcionalnu važnost (Park i sur. 2003). Protein NPC2 strukturno ne nalikuje NPC1. Okarakteriziran je kao sekretorni glikoprotein koji se nalazi u lumenu kasnih endosoma, te ima vrlo velik afinitet za vezanje kolesterola. Mutacije koje onemogućuju vezanje kolesterola uzrokuju fenotip bolesti (Ko i sur. 2003). Iako direktna interakcija proteina NPC1 i NPC2 još nije pokazana, čini se da sudjeluju u istom putu (Subramanian i Balch 2008).

Iako su oba proteina vrlo važna u transportu lipida, njihova točna molekularna uloga još uvijek nije poznata. Smatra se kako je NPC1 posrednik u endosomalnom sortiranju kolesterola i drugih lipida (Ioannou 2001), te je predloženo da funkcionira kao transmembranska lipidna pumpa (Davies i sur. 2000). Nedavni dokazi upućuju na ulogu NPC1 u regulaciji razine Ca^{2+} iona u kasnim endosomima i lizosomima. Reguliranje razine kalcija u NPC1^{-/-} stanicama ujedno predstavlja i novi pristup liječenju bolesti, pošto podizanje razine citosolnog kalcija normalizira NPC1 fenotip i produljuje preživljavanje NPC1 knock-out miševa (Lloyd-Evans i sur. 2008). NPC1 se nalazi na membrani kasnih endosoma, te u manjoj mjeri u trans-Golgijevoj mreži, reciklirajućim endosomima i endoplazmatskom retikulumu (Ory 2000). Nakon akumulacije kolesterola u kasnim

endosomima uočena je lokalizacija NPC1 u kasnim endosomima i lizosomima (Garver i sur. 2000; Higgins i sur. 1999). Uočeno je i premještanje NPC1 u rane endosome u stanicama tretiranim s U18666A¹ (Sugimoto i sur. 2001). Ovi podaci predlažu da se NPC1 nakon nakupljanja kolesterola i drugih lipida premješta u ranije organele endocitoznog puta.

U normalnim stanicama, kolesterol koji potječe iz LDL čestica se oslobađa u lizosomima, odakle se prenosi u endoplazmatski retikulum (ER), te natrag na plazma membranu. Međutim, ukoliko je protein NPC1 nefunkcionalan, kolesterol neće moći prijeći iz kasnih endosoma i lizosoma u ER, te počinje njegovo nakupljanje u tim organelima. Navedeni događaji uzrokuju „zastoj u prometu lipida“ (engl. *lipid traffic jam*) (Puri i sur. 1999; Simons i Gruenberg 2000).

Kako je veza između kolesterola i A β otkrivena i u bolesti NPC, ona se koristi kao model za istraživanje uloge kolesterola u patogenezi AB. Pronađeno je da nivo staničnog kolesterola snažno utječe na akumulaciju peptida A β ₄₂, te njegovo nakupljanje u kasnim endosomima, a nakupljanje A β ₄₂ je uočeno i u mozgu NPC1^{-/-} transgeničnih miševa (Yamazaki i sur. 2001). Pokazano je da je narušavanje normalnog prometa kolesterola povezano s procesiranjem proteina APP. Nakupljanje kolesterola dovodi do redistribucije PS1, povišene aktivnosti γ -sekretaze, akumulacije odsječka C99, te povišene razine A β ₄₀ i A β ₄₂ (Burns i sur. 2003). Tretiranje neurona s U18666A je također rezultiralo povišenim razinama C99 i A β ₄₂, koji su se nakupljali u ranim i kasnim endosomima (Jin i sur. 2004). Međutim, točan mehanizam utjecaja kolesterola na nakupljanje A β se tek mora razjasniti.

¹ Spoj koji inducira nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima

Cilj rada

Cilj ovog rada bio je ispitati utječe li nakupljanje kolesterola u bolesti NPC na smještaj proteina APP i PS1 u organelima endocitoznog puta. Očekujem da nakupljanje kolesterola u ranim i kasnim endosomima te lizosomima u bolesti NPC uzrokuje premještanje proteina APP i PS1 u iste organele. Nadalje, pretpostavljam da promjena u smještaju ovih proteina dovodi do povećane sinteze peptida A β i odsječka C99. Svi očekivani rezultati bi trebali pridonijeti objašnjenju utjecaja kolesterola na procesiranje proteina APP te na nastanak Alzheimerove bolesti.

Ciljevi:

- napraviti stanične linije stanica CHOwt (engl. *Chinese Hamster Ovary*) i CHO NPC1^{-/-} (CHO NPC1-null, stanice CHO kojima nedostaje *NPC1* gen, te tako oponašaju NPC bolest) koje stabilno ekspimiraju konstrukt HA-SEAP-APPwt, te provjeriti razinu ekspresije proteina APP western analizom i imunofluorescencijskom mikroskopijom
- pratiti smještaj proteina APP i PS1 u endocitoznom putu u gore navedenim stabilnim staničnim linijama metodom imunofluorescencijske mikroskopije

Materijali i metode

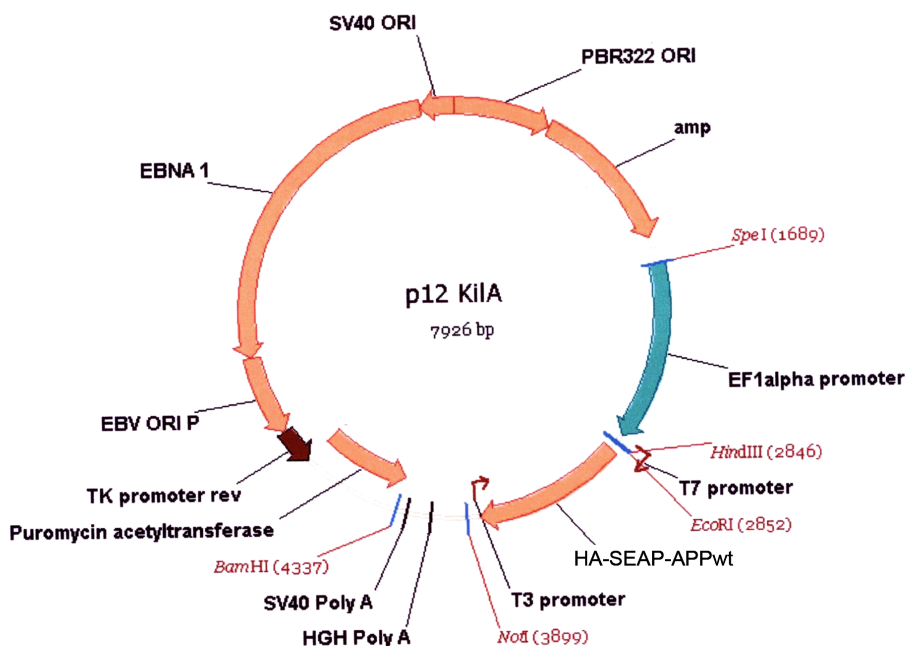
Stanične linije

Korištene su stanice jajnika kineskog hrčka divljeg tipa (CHOWt) i stanice koje su nul-mutanti za gen *NPC1* CHO *NPC1*^{-/-}, dobivene od Dr. Daniel Oryja, Washington University School of Medicine, St. Louis, SAD). Stanice su uzgajane u DMEM:F12 mediju (1:1) (engl. *Dulbecco Modified Eagle's Medium : Nutrient Mixture*) (Gibco, SAD), nadopunjenom s 10% fetalnog seruma goveda (FBS, Gibco), 2 mM L-glutaminom (Gibco) i otopinom antibiotika penicilina (10 mg/mL, Gibco) i antimetotika streptomcina (25 µg/mL, Gibco).

Stvaranje stabilnih staničnih linija

Na ploče za uzgoj stanica promjera 10 cm nasađeno je 10⁶ stanica, koje su transfecirane konstruktom koji sadrži APP cDNA (HA-SEAP-APPwt, dobiven ljubaznošću Dr. Stefana Lichenthalera, Ludwig-Maximilians University, München, Njemačka), koristeći GeneJuice (Novagen, Njemačka) transfekcijski reagens. Transfekcijska smjesa se sastojala od 100 µL DMEM-a (bez FBS-a), u koji je dodano 3 µL GeneJuice-a i 2 µg DNA (konstrukt s cDNA HA-SEAP-APPwt). Nakon 15-30 min inkubacije smjese pri sobnoj temperaturi, smjesa je nakapana na stanice koje su bile 80% konfluentne.

24-48h nakon transfekcije, stanicama je promijenjen medij te je dodan isti medij (DMEM/F12+10%FBS) s odgovarajućim antibiotikom, u ovom slučaju puromicinom (10 µg/mL, Sigma, SAD). Sljedećih dana je promatran rast/odumiranje stanica, a medij se mijenjao po potrebi, svaka 2-3 dana. Netransfecirane stanice su brzo odumirale, a počele su se pojavljivati izolirane kolonije, koje su sve više rasle. Nakon što su kolonije dostigle određenu veličinu, stanice su tripsinizirane, te nasađene u T-75 bocu. Nakon što su postigle konfluentnost, tripsinizirane su i smrznute na odgovarajući način do daljnje upotrebe. Na ovaj način je dobivena mješovita kultura stabilnih staničnih linija (engl. *pooled stables*).



Slika 4. Vektor p12 KIL A. HA-SEAP-APPwt se nalazi između HindIII i NotI restrikcijskih mjesta (poklon Dr. H. Steinera).

Uspješnost stabilne transfekcije je provjerena Western analizom proteina APP u staničnom lizatu i imunofluorescencijom.

Bojanje slobodnog kolesterola filipinom

Kako bih odredila smještaj slobodnog kolesterola, bojala sam stanice filipinom (Filipin Complex, Sigma, SAD). Filipin je antibiotik izoliran iz aktinomiceta *Streptomyces filipinensis*, ima svojstvo fluorescencije te se snažno veže na slobodni kolesterol. Stanice, uzgajane na stakalcima promjera 12 mm (Sarstedt, Njemačka) u pločicama s 24 bunarića, su isprane tri puta u puferu PBS, fiksirane 20 minuta u 4% paraformaldehidu u puferu PBS na sobnoj temperaturi te ponovno isprane tri puta u puferu PBS. Stanice su bojane 30 minuta u filipinu (50 µg/mL) u puferu PBS, uz dodatak 10% seruma fetusa goveda (FBS, Gibco). Stanice su ponovno isprane dva puta u puferu PBS i posljednji put u kvarcnoj (mQ) vodi. Pokrovna stakalca su zatim uklopljena u mediju za uklapanje (Fluka) te promatrana fluorescencijskim mikroskopom (OlympusBX51) pri ekscitaciji 360 nm i emisiji 465 nm.

Priprava staničnog lizata

Za pripravu ukupnog staničnog lizata (engl. *TCL, total cell lysate*) stanice uzgajane na ploči za uzgoj promjera 10 cm lizirane su pri konfluentnosti od 90-100%. Svi sljedeći koraci izvođeni su na ledu. Stanicama je odsisan medij, te su isprane tri puta puferom PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4 , pH 7,3). U posljednjem ispiranju je bitno ukloniti što je više moguće PBS-a. Stanice se potom liziraju u 800 μL pufera Co-IP (50 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40, 0,5% Triton X100) u koji je dodan koktel proteaznih inhibitora (*Complete Mini Protease inhibitor cocktail*, Roche). Stanice se postružu plastičnim strugačem stanica (engl. *cell scraper*), a dobiveni lizati se prebace u ohlađene tubice od 1,5 mL. Tubice su inkubirane na ledu 10 min. Lizati se potom centrifugiraju 10 min, pri maksimalnoj brzini centrifuge od 13 200 rpm (15 600 g) pri 4°C (Eppendorf mikrocentrifuga 5415R), nakon čega se talog baci, a supernatant koristi dalje za određivanje proteina i elektroforezu.

Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracija proteina korišten je *DC Protein assay* (Bio-Rad Laboratories, SAD), koji se temelji na određivanju koncentracije proteina po Lowryju. Metoda se zasniva na reakciji između proteina i bakra u lužnatom mediju te naknadnoj redukciji Folinovog reagensa. Kao standard za određivanje baždarnog pravca se koriste razrijeđenja (0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 mg/mL) goveđeg albumina iz seruma (BSA, Bio-Rad). Na pločice s 96 bunarića se nanosi redom 5 μL pojedinog razrijeđenja standarda i 5 μL odgovarajućeg razrijeđenja uzorka, zatim 25 μL otopine A (lužnata otopina bakrova tartarata), te 200 μL otopine B (razrijeđeni Folinov reagens). Nakon 15 min absorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 750 nm (Multiskan EX, Thermo Scientific, SAD). Koncentracija proteina (mg/mL) se određuje prema baždarnom pravcu.

Elektroforeza u gelu poliakrilamida

Proteini su razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Gel se sastoji od dva dijela: donjeg, 8%, gela za razdvajanje (engl. *separating*), i gornjeg, 5%, sabijajućeg gela (engl. *stacking*). Detaljan sastav ovih gelova prikazan je u tablici 2.

Tablica 1. Sastav Tris-glicine poliakrilamidnih gelova.

	5% gel (5 mL)	8% gel (5 mL)
H₂O	3,4	2,35
30% otopina akrilamida i bisakrilamida (29:1)	0,83	1,3
1.5 M Tris (pH 8.8)	-	1,3
1.0 M Tris (pH 6.8)	0,63	-
10% APS	0,05	0,05
TEMED	0,005	0,003

Prije nanošenja na gel, uzorcima staničnog lizata se doda pufer za nanošenje uzoraka – PLD, od engl. *protein loading dye* (6xPLD: 6,0 mL glicerola, 1,2 g SDS-a, 0,31g DTT-a, 1,25 mL 0,5 M pufera Tris pH 6,8, boja bromfenol plavo, nadopuniti s vodom do ukupnog volumena 10 mL) te se potom denaturiraju 10 min pri 70°C. Ovako pripremljeni uzorci su spremni za nanošenje u jažice gela. Kao proteinski standard pri elektroforezi je korišten SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Elektroforeza se provodila pri naponu od 100V (kasnije 120V), u puferu sastava Tris baza (3 g/L), glicin (14,4 g/L) i SDS (1 g/L) u deH₂O.

Nakon elektroforeze, uslijedio je transfer proteina na polivinilnu membranu (PVDF, Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Transfer se provodio pri stalnom jakosti struje od 400 mA, 60 min, u puferu za transfer sastava 200 mL/L metanola, 14,4 g/L glicina i 3,03 g/L tris baze u deH₂O.

Western analiza

PVDF membrane s transferiranim proteinima su blokirane 30 min u 5% nemasnom mlijeku (Carnation, Nestlé, Švicarka) otopljenom u TBST puferu (20 mol/dm³ pufera Tris·HCl (pH 7,5), 0,15 mol/dm³ NaCl, 0,005% Tween-20 u deH₂O), uz stalnu trešnju. Blokirana membrana se inkubira preko noći u otopini primarnog protutijela (odgovarajućeg razrijeđenja u nemasnom mlijeku). Nakon uklanjanja primarnog protutijela, membrana se ispiri 3 puta po 10 min u TBST puferu, kako bi se uklonilo nespecifično vezano protutijelo. Potom se membrana inkubira 90 min u sekundarnom protutijelu koje je konjugirano s peroksidazom iz hrena (Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG

(H+L)-HRP-Conjugate, Bio-Rad Laboratories, SAD), razrijeđenom 1:3000 u nemasnom mlijeku. Zatim se ponovno ispiru 3 puta po 10 min u TBST puferu, te se na nju stavlja supstrat peroksidaze BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate (Roche, Njemačka). Nakon 5 min inkubacije supstrata, signal se vizualizira na filmu (Lumi-film chemiluminescent detection film, Roche), s različitim vremenima ekspozicije. Koristi se uređaj za razvijanje Curix 60 (AGFA).

Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija

Stanice, uzgajane na stakalcima promjera 12 mm (Sarstedt, Njemačka) u pločicama s 24 bunarića, su ispirane u hladnom PBS puferu, te fiksirane 20 min u 4% paraformaldehidu u PBS puferu pri sobnoj temperaturi. Potom su ponovno ispirane u PBS puferu, inkubirane 10 min u 0.2% saponinu u PBS puferu pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja saponina stanice nisu ispirane. Nakon toga su blokirane 1h u 5% kozjem serumu u PBS puferu pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja seruma, slijedi inkubacija u primarnom protutijelu razrijeđenom u puferu za blokiranje preko noći (za korištena razrjeđenja vidi tablicu 1), u tamnoj i vlažnoj komorici. Stanice se sutradan isperu u PBS puferu, te inkubiraju 1h u sekundarnom protutijelu (anti-Alexa488 ili anti-Alexa594, Invitrogen) u mraku. Stanice se naposljetku isperu u PBS puferu i posljednji put u kvarcnoj (mQ) vodi, te uklope u medij za uklapanje (Fluka) na predmetnom stakalcu. Stanice su promatrane konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP2 AOBS.

Tablica 2. Protutijela korištena u imunofluorescencijskoj mikroskopiji.

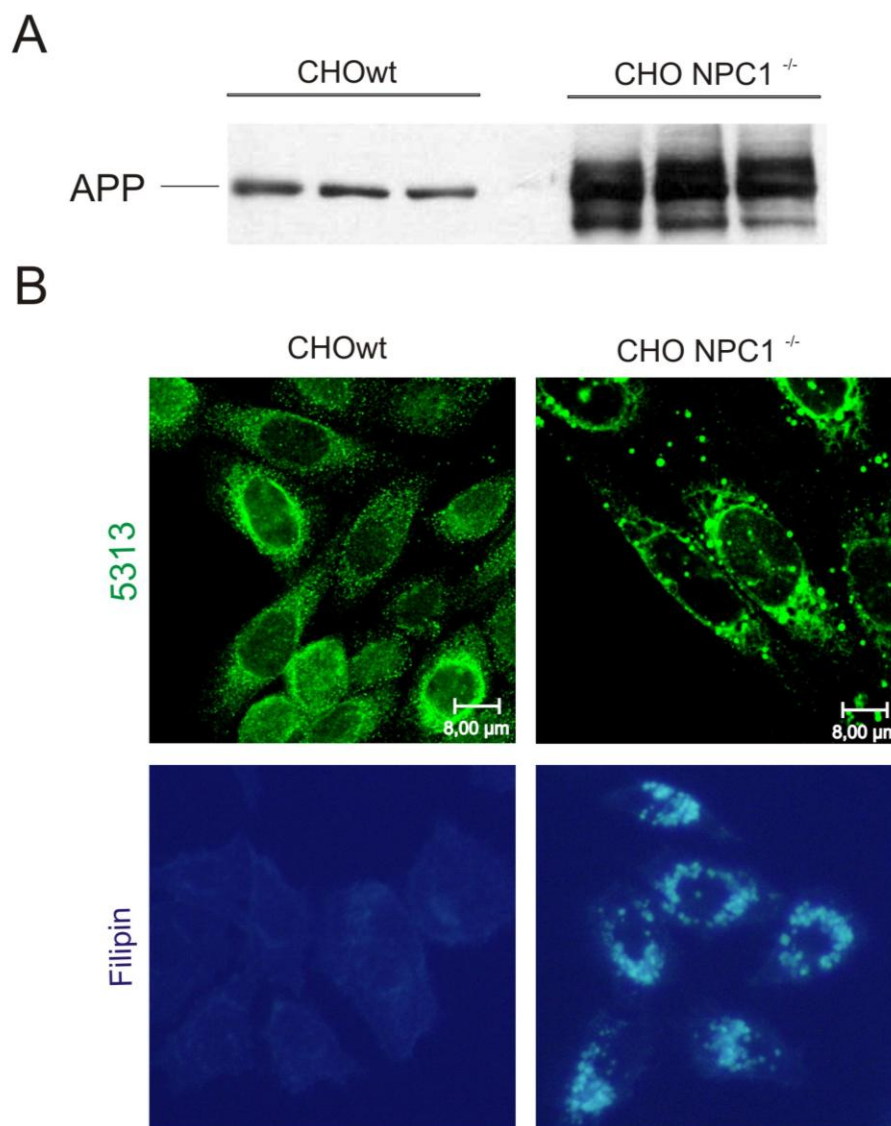
Protutijelo	Organel/protein	Proizvođač/poklon od	Razrijeđenje
EEA1	Rani endosomi	BD Transduction Laboratories	1:250
Rab7	Kasni endosomi	Santa Cruz Biotechnology	1:50
5313	N-terminus proteina APP	Dr. Christian Haass	1:500
6687	C-terminus proteina APP	Dr. Harald Steiner	1:100
13G8	C-terminus proteina APP	Dr. Peter Seubert	1:250
Nixon	Presenilin 1	Dr. Harald Steiner	1:200
2953	Presenilin 1	Dr. Harald Steiner	1:200
Receptor transferina (TfR)	Reciklirajući endosomi (engl. <i>recycling endosomes</i>)	Zymed Laboratories Inc.	1:100
Anti-HA	hemaglutinin	UMC, Utrecht, Nizozemska	1:500

Rezultati

Uspostava staničnih linija CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno ekspimiraju protein APP

Kako bih mogla pratiti smještaj proteina APP između stanica CHOwt i CHO NPC1^{-/-} bilo je potrebno napraviti stanične linije koje stabilno ekspimiraju protein APP, i u kojima je razina proteina APP tolika da omogućuje njegovu detekciju imunofluorescencijom. Pri tom sam koristila konstrukt koji je sadržavao HA-SEAP-APPwt cDNA (dobiven ljubaznošću Dr. Stefana Lichenthalera, Ludwig-Maximilians University, München, Njemačka). Stanice sam prolazno transfecirala ovim konstruktom koristeći transfekcijski reagens GeneJuice kao što je opisano u materijalima i metodama te sam nakon 48 h ekspresije promijenila medij za uzgoj stanica i započela selekciju u prisutnosti antibiotika puromicina (10 µg/mL) u mediju. Stanice koje su bile rezistentne na ovaj antibiotik su bile dokaz da stabilno ekspimiraju navedeni konstrukt. Nakon što sam uzgojila stabilne stanične linije CHOwt i CHO NPC1^{-/-} koje ekspimiraju protein HA-SEAP-APPwt, ispitala sam razinu proteina APP western analizom u staničnim lizatima (slika 1A), te lokalizaciju imunofluorescencijom (slika 1B).

Iz slike 5A je vidljivo kako razina stabilno ekspimiranog proteina APP nije jednaka u staničnim linijama CHOwt i CHO NPC1^{-/-}. Njegova ekspresija je znatno viša u stabilnoj staničnoj liniji CHO NPC1^{-/-} u odnosu na CHOwt. Međutim, kako je moj cilj bio ispitati smještaj, a ne razinu proteina APP u stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHOwt, ovo svojstvo mi nije smetalo (slika 5B), te su ove stanične linije korištene u daljnjim pokusima. Naime, iz slike 5B se može uočiti jasna razlika u smještaju proteina APP između stanica CHOwt i CHO NPC1^{-/-}. Dok je u stanicama CHOwt vizualizacija proteina APP dala difuzno i više perinuklearno obojenje, u stanicama CHO NPC1^{-/-} ono je bilo više točkasto i periferno.



Slika 5. Analiza ekspresije proteina APP u staničnim linjama CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno eksprimiraju konstrukt HA-SEAP-APPwt. A) Western analiza proteina APP u staničnom lizatu. Analiza je rađena u triplicatu s jednakom količinom proteina na gelu. U analizi sam koristila protutijelo 22C11 (1:1000, Chemicon). **B)** Ispitivanje smještaja proteina APP imunofluorescencijom. Pri tom sam koristila protutijelo 5313 (dobiveno ljubaznošću Dr. Stefana Lichenthalera, Ludwig-Maximilians University, München, Njemačka, 1: 500). Slobodni kolesterol u stanicama je vizualiziran bojanjem filipinom (Filipin Complex, Sigma, SAD), te promatran fluorescencijskim mikroskopom ekscitacija 360 nm emisija 465 nm.

Bojanjem slobodnog kolesterola u stanici filipinom, uočila sam znatno jači signal u stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHOwt. Uočeni signal u stanicama CHO NPC1^{-/-} odgovara nakupinama kolesterolom bogatih vezikularnih organela u citoplazmi, najvjerojatnije kasnih endosoma i lizosoma.

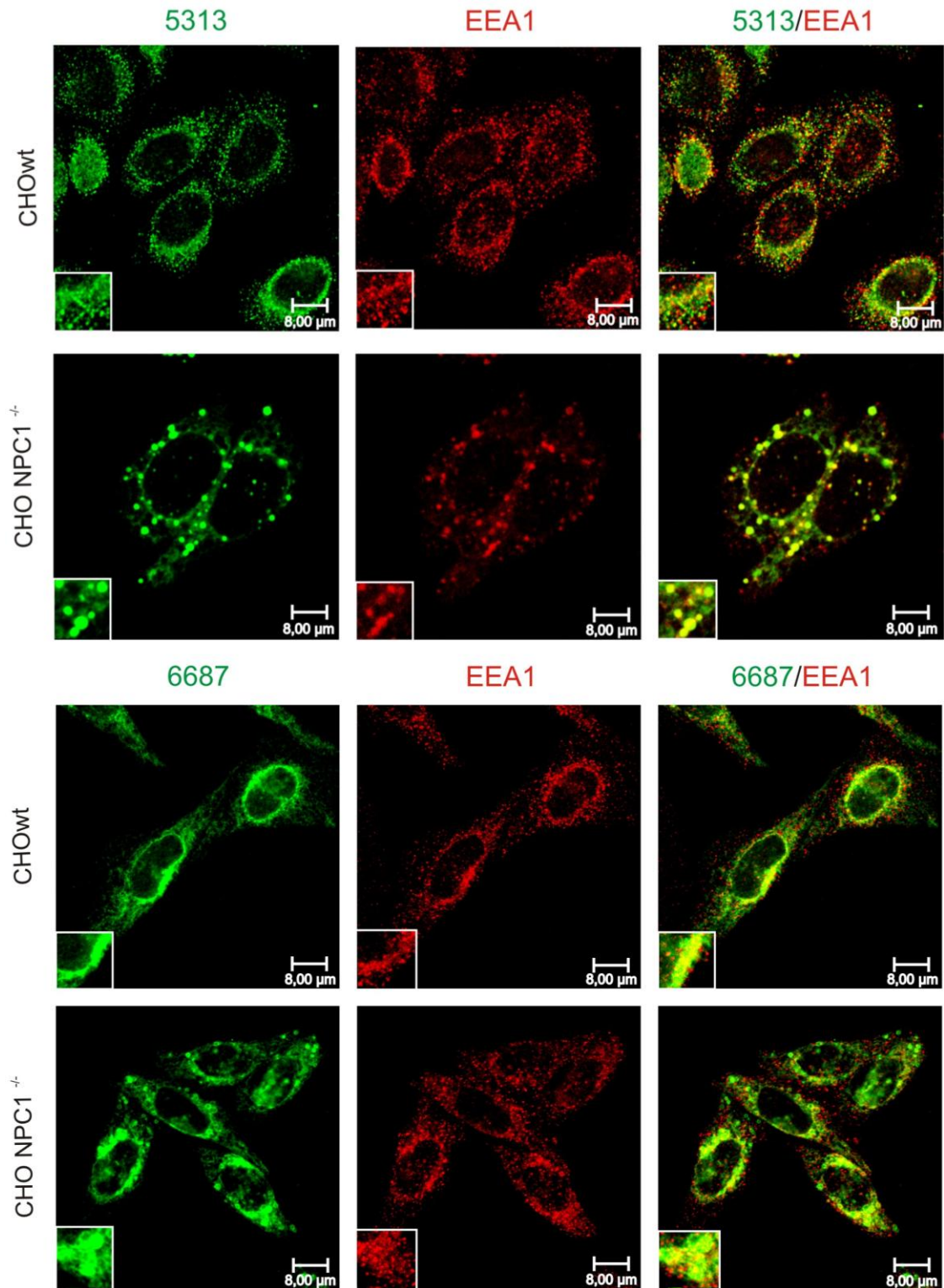
Ispitivanje smještaja proteina APP i njegovog C-terminalnog odsječka C99 u endosomalnom putu u staničnim linijama CHOwt i CHO NPC1^{-/-} koje stabilno eksprimiraju protein APP

Konfokalnom mikroskopijom sam analizirala utječe li nakupljanje kolesterola u stanicama CHO NPC1^{-/-} na smještaj proteina APP i odsječka C99 u odnosu na stanice CHOwt. Pri tome sam koristila stabilne stanične linije opisane na slici 5. Kao biljeg ranih endosoma sam koristila protutijelo EEA1, a za kasne endosome sam koristila protutijelo Rab7. Rezultati su prikazani na slici 6 i 7. Intenzitet bojanja ranih i kasnih endosoma u stanicama CHO NPC1^{-/-} bio je znatno jači u odnosu na signal u stanicama CHOwt. To ukazuje na prisutnost većeg broja ili povećanih ranih i kasnih endosoma u stanicama CHO NPC1^{-/-}.

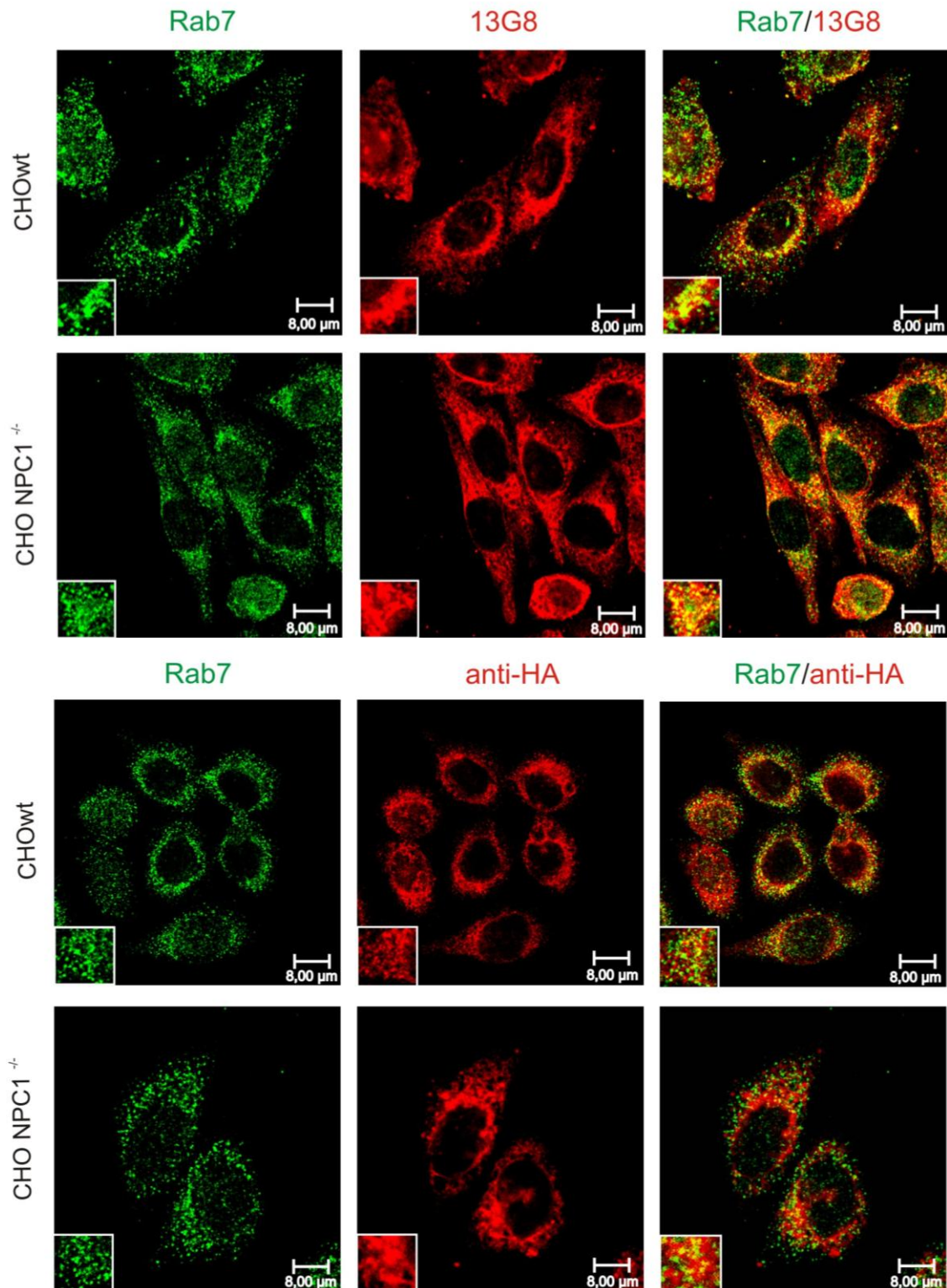
Opazila sam povećanu kolokalizaciju proteina APP (protutijelo 5313) i odsječka C99 (protutijelo 6687) u ranim endosomima (EEA1 protutijelo) u stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHOwt. Naime, u stanicama CHOwt sam uočila ravnomjernu distribuciju proteina APP i C99, te smještaj većinom u perinuklearnim organelima, dok su u stanicama CHO NPC1^{-/-} isti proteini smješteni u malim vezikularnim organelima koje su smještene više periferno (slika 6). Ukupni intenzitet signala proteina APP/C99 se nije razlikovao među navedenim staničnim linijama. Nisam opazila promijenjenu kolokalizaciju proteina APP (protutijelo anti-HA) i odsječka C99 (protutijelo 13G8) u kasnim endosomima u stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHOwt (slika 7).

Osim smještaja proteina APP/C99 u ranim i kasnim endosomima, ispitala sam i smještaj u reciklirajućim endosomima (slika 8). Kao marker reciklirajućih endosoma koristila sam receptor transferina (engl. *transferrin receptor*, TfR). Bojanje obiju staničnih linija je dalo perinuklearni signal, međutim u stanicama CHO NPC1^{-/-} je uočena veća zastupljenost signala u vezikularnim organelima na periferiji.

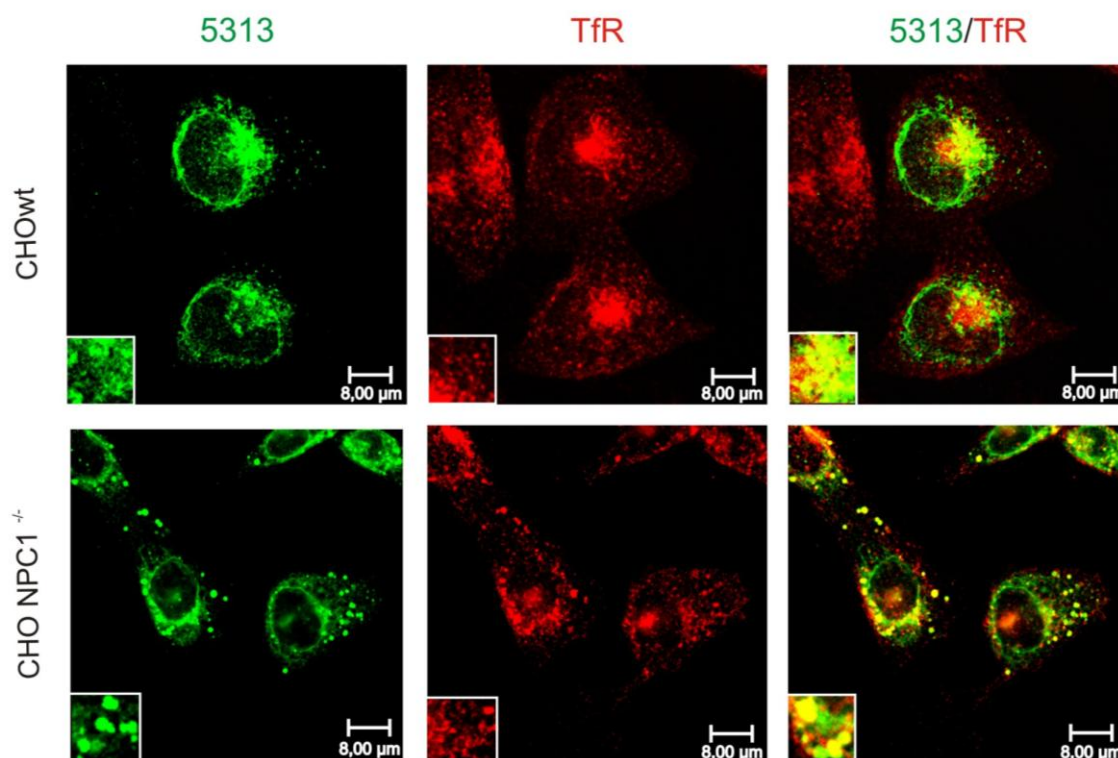
Promatrajući smještaj proteina APP između stanica CHOwt i CHO NPC1^{-/-}, u oba slučaja sam primijetila kolokalizaciju sa transferin receptorom. Međutim, u stanicama CHOwt signal je bio smješten perinuklearno, dok sam u stanicama CHO NPC1^{-/-} jaču kolokalizaciju uočila periferno u vezikularnim organelima.



Slika 6. Ispitivanje smještaja proteina APP i odsječka C99 u endosomalnom putu stanica CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} metodom konfokalne mikroskopije. Stanice sam inkubirala s biljekom ranih endosoma (EEA1, BD Transduction Laboratories), dok sam protein APP sam vizualizirala bojanjem s protutijelom 5313 (poklon Dr. C. Hassa) i 6687 (poklon Dr. H. Steiner). Pokazala sam da u stanicama CHO NPC1^{-/-} postoji snažnija kolokalizacija proteina APP i biljega EEA1 u perifernim vezikularnim organelima, u odnosu na stanice CHOwt u kojima je njihova kolokalizacija uglavnom perinuklearna.



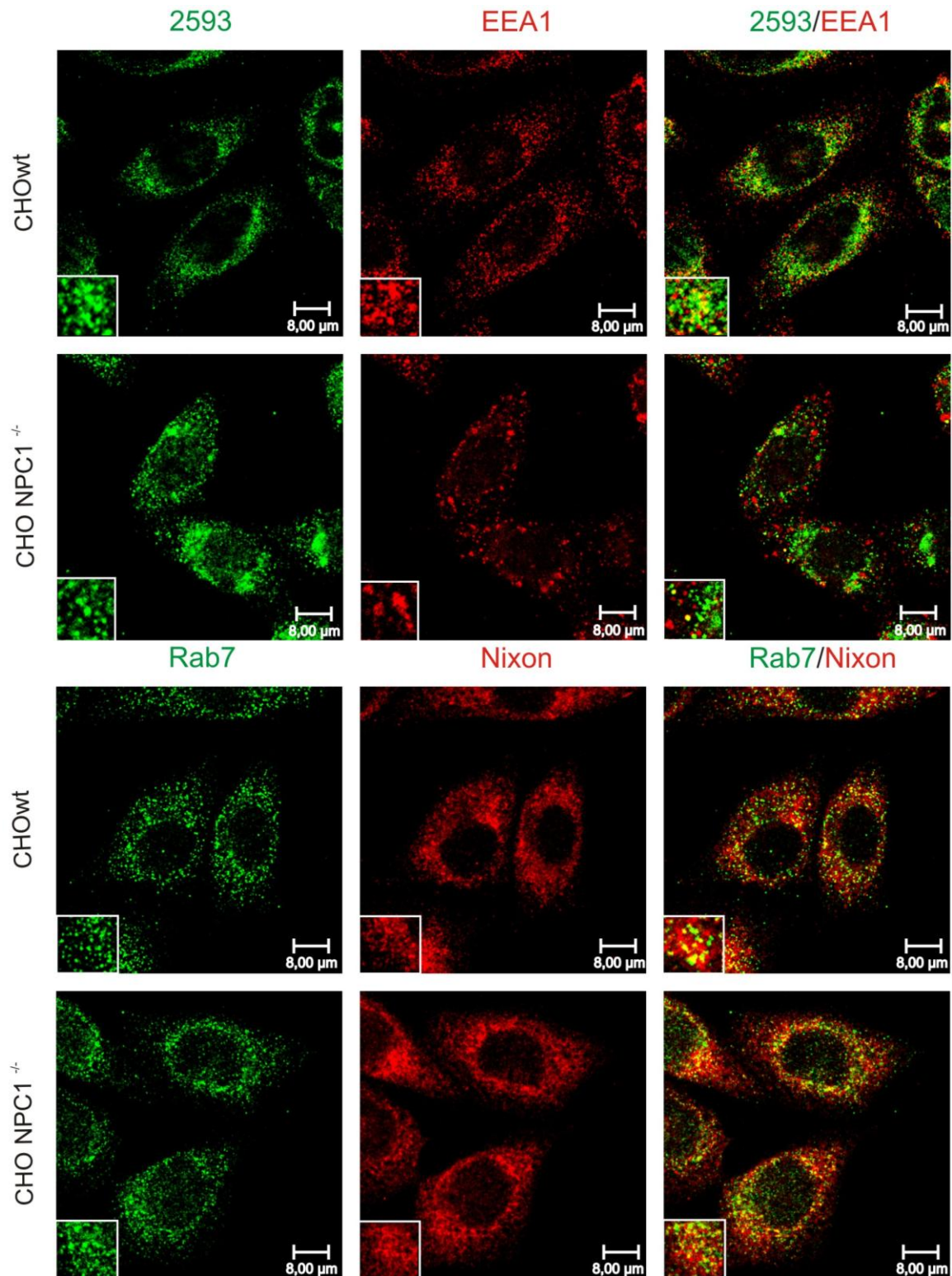
Slika 7. Ispitivanje smještaja proteina APP i odsječka C99 u endosomalnom putu stanica CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} metodom konfokalne mikroskopije. Stanice sam inkubirala s biljekom kasnih endosoma (Rab7, Santa Cruz Biotechnology), a protein APP sam vizualizirala s markerima 13G8 (poklon Dr. Peter Seuberta) i anti-HA (UMC, Utrecht, Nizozemska). Nisam primijetila različitu kolokalizaciju proteina APP i kasnih endosoma stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na stanice divljeg tipa.



Slika 8. Ispitivanje smještaja proteina APP i odsječka C99 u endosomalnom putu stanica CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} metodom konfokalne mikroskopije. Stanice sam inkubirala s biljekom reciklirajućih endosoma (TfR, Zymed Laboratories Inc.) i anti-APP protutijelom 5313. Pokazala sam da u stanicama CHO NPC1^{-/-} postoji snažnija kolokalizacija proteina APP (protutijelo 5313) i receptora transferina (protutijelo TfR perifernim vezikularnim organelima, u odnosu na stanice CHOwt.

Ispitivanje smještaja proteina PS1 u ranim i kasnim endosomima u stanicama CHOwt i CHO NPC1^{-/-}

Konfokalnom mikroskopijom sam analizirala i smještaj proteina PS1 u ranim i kasnim endosomima u stanicama CHOwt i CHO NPC1^{-/-}. Kao biljeg ranih endosoma koristila sam protutijelo EEA1, a kasnih endosoma protutijelo Rab7. Protein PS1 sam vizualizirala bojanjem s protutijelima 2593 i Nixon (dobiveni ljubaznošću dr. Haralda Steinera, Ludwig-Maximilians University, München, Njemačka). Iako APP i odsječak C99 pokazuju povećanu kolokalizaciju u ranim i reciklirajućim endosomima u stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na CHOwt, nisam uočila promijenjenu lokalizaciju endogenog proteina PS1 između navedenih staničnih linija (slika 9).



Slika 9. Ispitivanje smještaja proteina PS1 u endosomalnom putu stanica CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} metodom konfokalne mikroskopije. Stanice sam inkubirala s biljekom ranim endosoma (EEA1, BD Transduction Laboratories) ili kasnih endosoma (Rab7, Santa Cruz Biotechnology), te anti-PS1 protutijela 2593 i Nixon (poklon Dr. H. Steinera). Nisam uočila promjenu u lokalizaciji proteina PS1 u stanicama CHO-NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHOwt.

Rasprava

U posljednjih nekoliko godina pojavilo se mnogo dokaza o ulozi kolesterola i drugih lipida u patogenezi Alzheimerove bolesti. Brojna istraživanja na staničnim kulturama i animalnim modelima ukazuju na ulogu kolesterola u metabolizmu proteina APP (Simons et al. 1998; Fassbender et al. 2001; Refolo et al. 2000; Refolo et al. 2001). Međutim, unatoč svim istraživanjima i mnogim otkrićima, točan molekularni mehanizam djelovanja kolesterola na proizvodnju i razinu peptida A β još uvijek nije rasvijetljen.

Kako je, osim u AB, ista veza između kolesterola i peptida A β uočena i u bolesti NPC (Yamazaki i sur. 2001; Burns i sur. 2003; Jin i sur. 2004), u svojim istraživanjima sam koristila stanice koje oponašaju bolest NPC (CHO NPC1^{-/-}). Cilj ovog rada bio je ispitati da li nakupljanje kolesteola u stanicama CHO NPC1^{-/-} uzrokuje promjenu smještaja proteina APP i presenilina 1 u organelima endocitoznog puta. Pretpostavila sam da učinak kolesterola nije direktan, već da kolesterol indirektno djeluje na ove proteine, tako da utječe na njihov smještaj.

Kako sam u istraživanju koristila stanice CHO koje ne eksprimiraju gen NPC1, prvo sam provjerila kakva je razina kolesterola u ovim stanicama. Bojanje filipinom je pokazalo da stanice CHO NPC1^{-/-} imaju povišenu razinu kolesterola u odnosu na CHOwt, te da dolazi do zadržavanja kolesterola u malim vezikularnim citoplazmatskim organelima. Ovo je u skladu s prethodnim istraživanjima, koja su pokazala da gubitak funkcije gena NPC1 dovodi do nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima (Puri i sur. 1999; Jin i sur. 2004).

Kako bih mogla pratiti smještaj proteina APP u stanicama CHOwt i CHO NPC1^{-/-} stabilno sam eksprimirala ovaj protein koji je na N-terminusu bio obilježen s biljekom hemaglutinina (HA) i biljekom ekstracelularne alkalne fosfataze (SEAP, od engl. *secreted alkaline phosphatase*) – HA-SEAP-APPwt. Koristila sam ovako obilježen protein zato što razina endogenog proteina nije bila dovoljna da bih ga mogla vizualizirati imunofluorescencijom, a ujedno je olakšana vizualizacija primjenom protutijela anti-HA. Osim toga, s obzirom da prolazna transfekcija izaziva prekomjeru ekspresiju proteina pa tako i njegovo smještanje u organelima gdje obično ne bi bio prisutan, odlučila sam se na

pripravu mješovite kulture stabilno eksprimiranih staničnih linija (engl. *pooled stables*). Iako je western analizom utvrđeno da mješovita kultura stabilne stanične linije CHO NPC1^{-/-} posjeduje znatno veću ekspresiju proteina APP u odnosu na mješovitu kulturu stabilne stanične linije CHOwt, metodom imunofluorescencije sam pokazala da su obje stabilne stanične linije pogodne za vizualizaciju i praćenje smještaja proteina APP konfokalnom mikroskopijom.

Prethodna istraživanja su pokazala da nakupljanje kolesterola u stanicama neurona transgeničnog miša NPC kao i u stanicama tretiranim s U18666A (koje donekle oponašaju NPC fenotip) dovodi do premještanja proteina presenilina 1 u rane i kasne endosome. Kako bih pratila smještaj proteina APP i PS1 u stabilnim staničnim linijama CHOwt i CHO NPC1^{-/-} primijenila sam metodu imunofluorescencije i konfokalne mikroskopije. Analiza lokalizacije ova dva proteina u ranim i kasnim endosomima kao i u reciklirajućim endosomima pokazala je značajno promijenjen smještaj proteina APP u ranim i reciklirajućim endosomima (biljezi EEA1 i TfR) u stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHOwt. Međutim, za razliku od proteina APP, kod proteina PS1 nije uočena značajna razlika u smještaju između ove dvije stanične linije.

Bojanje proteina APP i odsječka C99 u stanicama CHO NPC1^{-/-} je dalo značajno drugačiji signal u odnosu na stanice CHOwt. Dok je u stanicama divljeg tipa imunofluorescencija proteina APP i C99 dala više perinuklearno i difuzno obojenje, u stanicama CHO NPC1^{-/-} ono je bilo više periferno i točkasto ukazujući na njegovo nakupljanje. Osim toga, zamijetila sam da biljeg ranih endosoma EEA1 daje znatno drugačije obojenje u stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na CHOwt što također ukazuje na aberantno funkcioniranje endocitoznog puta kao posljedice nakupljanja kolesterola uslijed disfunkcije proteina NPC1.

U skladu s prijašnjim rezultatima uočila sam promijenjen smještaj transferin receptora (TfR) između stanica CHOwt i CHO NPC1^{-/-}. U stanicama CHOwt signal je bio smješten perinuklearno, dok je u stanicama CHO NPC1^{-/-} signal bio jači na periferiji. Pipalia i sur. su pokazali da se TfR sporije reciklira u stanicama CHO NPC1^{-/-} i nakuplja u reciklirajućim endosomima te su pretpostavili da ovaj defekt dovodi do smanjene razine TfR na površini stanice. U skladu s ovim, moji preliminarni rezultati su ukazali na smanjenu

razinu TfR kao i proteina APP na površini stanica CHO NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHOwt (neobjavljeni rezultati).

Iako je ranije pokazan promijenjen smještaj proteina PS1 u stanicama NPC, imunofluorescencijom nisam uočila promijenjenu lokalizaciju endogenog proteina PS1 između navedenih staničnih linija. Razlog neslaganja mojih rezultata s već objavljenim rezultatima nije jasan. Pretpostavljam da razina endogenog proteina PS1 koju sam pratila u ovim stanicama ne daje jasan i specifičan signal metodom imunofluorescencije, te bi za pojašnjenje ovog rezultata bilo neophodno napraviti stanične linije koje stabilno ekspimiraju protein PS1, kao što sam napravila u slučaju analize smještaja proteina APP.

Analiza smještaja proteina APP metodom konfokalne mikroskopije je pokazala da uslijed nedostatka proteina NPC1 dolazi do akumulacije kolesterola, što dovodi do promijenjenog smještaja proteina APP u ranim i reciklirajućim endosomima u stanicama CHO NPC1^{-/-} u odnosu na stanice divljeg tipa. Smanjeni nivo proteina APP na površini stanice kao i njegova povećana kompartmentalizacija u ranim i reciklirajućim endosomima, sugerira da je povećanje C99/A β uzrokovano promijenjenom endocitozom (engl. *endocytic trafficking*) proteina APP. Upravo taj promijenjeni smještaj čini protein APP dostupnim β - i γ -sekretazi. Naime, nedavni rezultati (Malnar i sur., neobjavljeni rezultati) upućuju da akumulacija kolesterola uzrokuje povećano procesiranje proteina APP β -sekretazom. Poznato je da β -sekretaza optimalno radi pri nižim pH u endosomalnim organelima. Dakle, kolesterol vjerojatno utječe na smještaj proteina APP, te na taj način, indirektno modulira njegovo procesiranje. Kako u bolesti NPC dolazi do zastoja u prometu kolesterola, vjerojatno dolazi do zastoja u prometu cijelog niza proteina. Moji rezultati također idu u prilog ovoj hipotezi, da je primarni efekt kolesterola u patogenezi Alzheimerove bolesti promijenjena distribucija proteina APP u endocitoznom putu.

Sljedeća istraživanja bi trebala utvrditi je li promijenjen smještaj proteina APP u stanicama NPC posljedica njegove povećane internalizacije ili smanjenog recikliranja na površinu stanice. Nadam se da će moji rezultati doprinijeti rasvjetljavanju molekularne povezanosti između kolesterola i nastanka Alzheimerove bolesti.

Zaključak

Promijenjeno procesiranje prekursora proteina amiloid β (APP) u vidu povećane sinteze i promijenjenog metabolizma peptida amiloid beta ($A\beta$) smatra se ključnim događajem u razvoju Alzheimerove bolesti. Sve je više dokaza koji potvrđuju snažnu vezu između kolesterola i AB. Utvrđeno je pokusima *in vitro* i *in vivo* da razina kolesterola regulira procesiranje proteina APP, te utječe na stvaranje i razinu peptida $A\beta$. Niemann Pickova bolest tipa C (NPC) se pokazala kao dobar model u proučavanju veze između kolesterola i AB, jer i u ovoj bolesti uslijed nakupljanja kolesterola (kao posljedice nedostatka proteina NPC1) dolazi do značajnog povećanja razine $A\beta$, odsječka C99, te progresivne neurodegeneracije. Međutim, precizan molekularni mehanizam ove veze je još uvijek nepoznat.

Cilj ovog rada je bio ispitati izaziva li nakupljanje kolesterola u bolesti NPC promijenjen smještaj proteina APP i aktivne komponente γ -sekretaze – presenilina 1 (PS1) u staničnim organelima endocitoznog puta. Pokazala sam da:

- stanice CHO NPC1^{-/-} pokazuju promijenjen smještaj proteina APP u ranim (biljeg EEA1) i reciklirajućim endosomima (biljeg TfR).
- stanice CHO NPC1^{-/-} pokazuju promijenjeno bojanje biljega EEA1 (rani endosomi) i TfR (reciklirajući endosomi), ukazujući na njihovo nakupljanje na periferiji stanice u odnosu na stanice CHOwt.
- stanice CHO NPC1^{-/-} ne pokazuju promijenjen smještaj proteina PS1 u organelima endocitoznog puta u odnosu na stanice CHOwt.

Ovi rezultati ukazuju da bi kolesterol mogao djelovati na nastanak Alzheimerove bolesti na način da regulira smještaj proteina APP unutar staničnih organela endocitoznog puta, te da ova preraspodjela proteina APP dovodi do povećanog stvaranja odsječka C99, a kasnije i peptida $A\beta$ u ovim organelima. Otkriće veze između kolesterola i AB važno je za razvoj liječenja. Ovi rezultati doprinose rasvjetljavanju mehanizma djelovanja kolesterola na metabolizam proteina APP i sintezu peptida $A\beta$ te ukazuju da bi kontroliranje razine kolesterola moglo doprinijeti prevenciji ili usporavanju progresije Alzheimerove bolesti.

Literatura

- Annaert, W. i De Strooper, B., 2000. Neuronal models to study amyloid precursor protein expression and processing in vitro. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1502(1), 53-62.
- Burns, M. i sur., 2003. Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5645-5649.
- Carstea, E.D. i sur., 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5323), 228-231.
- Christian Haass i sur., 1992. Amyloid $[\beta]$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.
- Corder, E.H. i sur., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), 921-923.
- Cruz, L. i sur., 1997. Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7612-7616.
- Davies, J.P., Chen, F.W. i Ioannou, Y.A., 2000. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5500), 2295-2298.
- Distl, R. i sur., 2003. Cholesterol storage and tau pathology in Niemann-Pick type C disease in the brain. *The Journal of Pathology*, 200(1), 104-111.
- Fassbender, K. i sur., 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5856-5861.
- Förstl, H. i Kurz, A., 1999. Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249(6), 288-290.
- Frears, E.R. i sur., 1999. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport*, 10(8), 1699-1705.
- Garver, W.S. i sur., 2000. Localization of the murine Niemann-Pick C1 protein to two distinct intracellular compartments. *Journal of Lipid Research*, 41(5), 673-687.
- Grziwa, B. i sur., 2003. The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 6803-6808.
- Haass, C., Hung, A.Y. i Selkoe, D.J., 1991. Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(12), 3783-3793.

- Hardy, J. i Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353-356.
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J. i Grimm, M.O.W., 2007. Alzheimer's disease: the lipid connection. *Journal of Neurochemistry*, 103 Suppl 1, 159-170.
- Higgins, M.E. i sur., 1999. Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68(1), 1-13.
- Hung, A.Y. i Selkoe, D.J., 1994. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *The EMBO Journal*, 13(3), 534-542.
- Ikonen, E. i Hölttä-Vuori, M., 2004. Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Seminars in Cell i Developmental Biology*, 15(4), 445-454.
- Ioannou, Y.A., 2001. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(9), 657-668.
- Jin, L. i sur., 2004. Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *The American Journal of Pathology*, 164(3), 975-985.
- Kimberly, W.T. i sur., 2000. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3173-3178.
- Kimberly, W.T. i sur., 2001. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 40288-40292.
- Ko, D.C. i sur., 2003. The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2518-2525.
- Kuo, Y.M. i sur., 1998. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252(3), 711-715.
- Liscum, L., Ruggiero, R.M. i Faust, J.R., 1989. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 108(5), 1625-1636.
- Lloyd-Evans, E. i sur., 2008. Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature Medicine*, 14(11), 1247-1255.
- Nikolaev, A. i sur., 2009. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, 457(7232), 981-989.

- Ory, D.S., 2000. Niemann-Pick type C: a disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1529(1-3), 331-339.
- Ory, D.S., 2004. The niemann-pick disease genes; regulators of cellular cholesterol homeostasis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(2), 66-72.
- Park, W.D. i sur., 2003. Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Human Mutation*, 22(4), 313-325.
- Puri, V. i sur., 1999. Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nature Cell Biology*, 1(6), 386-388.
- Refolo, L.M. i sur., 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 321-331.
- Refolo, L.M. i sur., 2001. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 8(5), 890-899.
- Riddell, D.R. i sur., 2001. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Current Biology: CB*, 11(16), 1288-1293.
- Selkoe, D.J. i sur., 1988. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(19), 7341-7345.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol. Rev.*, 81(2), 741-766.
- Shoji, M. i sur., 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5079), 126-129.
- Simons, K. i Gruenberg, J., 2000. Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends in Cell Biology*, 10(11), 459-462.
- Simons, M. i sur., 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6460-6464.
- Subramanian, K. i Balch, W.E., 2008. NPC1/NPC2 function as a tag team duo to mobilize cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15223-15224.
- Sugimoto, Y. i sur., 2001. Accumulation of cholera toxin and GM1 ganglioside in the early endosome of Niemann-Pick C1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12391-12396.
- Vance, J.E., 2006. Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann-Pick C disease. *FEBS Letters*, 580(23), 5518-5524.

- Vassar, R. i sur., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), 735-741.
- Verhey, F.R.J., 2009. Alois Alzheimer (1864-1915). *Journal of Neurology*, 256(3), 502-503.
- Wahrle, S. i sur., 2002. Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiology of Disease*, 9(1), 11-23.
- Walter, M.F., Mason, P.E. i Mason, R.P., 1997. Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 inhibits lipid peroxidation as a result of its membrane interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 233(3), 760-764.
- Wolozin, B. i sur., 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Archives of Neurology*, 57(10), 1439-1443.
- Yamazaki, T. i sur., 2001. Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4454-4460.
- Zheng, H. i Koo, E.H., 2006. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*, 1, 5.